



Pullulan und Dextran – die ungleichen Zwillinge

Dr. Gerhard Heinzmann, Alina Heinzmann

Einleitung

Prinzipiell sind fast alle Polysaccharide aus derselben Grundeinheit aufgebaut: einem einfachen Zuckermolekül mit der chemischen Formel $C_6H_{12}O_6$ (Abbildung 1).

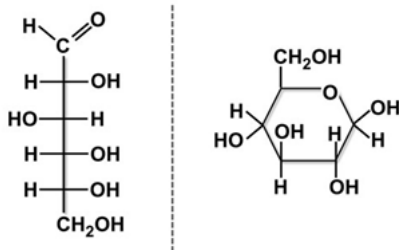


Abb. 1: Chemische Struktur der monomeren Zuckereinheit vieler Polysaccharide.

Links: Offene Struktur, Rechts: Ringstruktur

Anhand der beiden einfachsten Vertreter aus der Gruppe der Polysaccharide, Dextran und Pullulan, soll aufgezeigt werden, dass die unterschiedliche Verknüpfung der monomeren Zuckereinheiten zu strukturell verschiedenen Polysacchariden führen kann, die sehr unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen können. Für die Analyse der absoluten Molekulargewichtsverteilungen sind leistungsfähige Chromatographiesysteme mit modernen Detektoren notwendig. Ein einfacher Vergleich der verschiedenen Polysaccharide anhand ihrer Elutionszeiten führt zu falschen Resultaten.

Dextran und Pullulan – die einfachsten Vertreter aus der Gruppe der Polysaccharide

Um die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Polysaccharide verstehen zu können, muss man sich die unterschiedlichen Verknüpfungsstrukturen dieser Substanzen anschauen. Als sehr einfaches Beispiel kann man Dextran und Pullulan vergleichen; die

beiden Substanzen sind von der Chemie der Monomereinheiten her vollkommen identisch, lediglich die Verknüpfung der Monomere zu einem Polysaccharid ist unterschiedlich: Während Pullulan, das überwiegend von Mikroorganismen hergestellt wird, ein streng lineares Biopolymer darstellt, ist Dextran, ein Molekül, das eher aus pflanzlichen Quellen stammt, ein mit zunehmendem Molekulargewicht immer stärker verzweigtes Biopolymermolekül.

Vergleich von Dextran und Pullulan

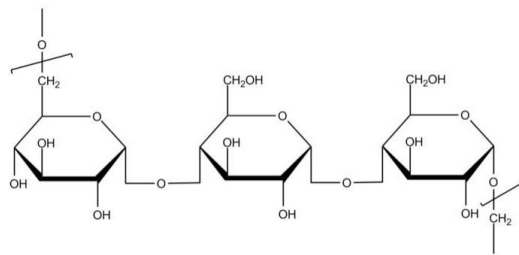


Abb. 2: Struktur von linearem Pullulan [1]

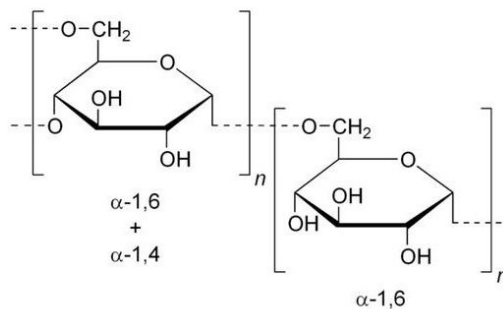


Abb. 3: Struktur von verzweigtem Dextran [1]

Pullulan ist ein natürliches, wasserlösliches, lineares Polysaccharid, das aus Maltotriose-Einheiten besteht (Abbildung 2). Drei Glucose-Einheiten der Maltotriose sind durch α -1,4-glycosidische Verbindungen miteinander verbunden, während aufeinanderfolgende Maltotriose-Einheiten durch α -1,6-Verbindungen zusammenhängen. Die Molmasse der Polymere liegt zwischen 10.000 und 400.000 Dalton. Pullulan

wird mithilfe des Pilzes *Aureobasidium pullulans* aus Stärke und Zucker produziert. Pullulan ist ein essbares, normalerweise geschmackloses Polymer. Da es durch die im Speichel enthaltenen Amylasen nicht spaltbar ist, wird es nicht verdaut und vom Körper wieder ausgeschieden. Auch als cellophanähnliche Verpackungsfolien findet Pullulan, vor allem in Japan, Verwendung für Lebensmittelverpackungen. Marktführer ist die japanische Firma Hayashibara [1].

Dextrane sind hochmolekulare, wasserlösliche, verzweigte, neutrale Biopolysaccharide, die Hefen und Bakterien als Reservestoffe dienen. Die glycosidische Bindung zu den Nachbar-Glucosemolekülen kann über 1,6-, 1,4- oder 1,3-, selten auch 1,2-Verknüpfung aufgebaut werden (Abbildung 3). Da Dextrane nur aus Glucose-Einheiten bestehen, zählen sie zu den Homoglycanen. Natürliche Dextrane besitzen Molekülmassen zwischen 10.000 und 50.000.000 Da. Sie werden von Bakterien der Gattung *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* und *L. dextranicum*) mittels Enzymen außerhalb der Zellen (extrazellulär) aus Saccharose hergestellt. Dextrane sind wasserlöslich, wobei die Löslichkeit von der Molekularmasse abhängt. Dabei bilden sich hochviskose, schleimartige Flüssigkeiten. Der kolloidosmotische Druck einer sechsprozentigen wässrigen Lösung von Dextranen mit einer molaren Masse von etwa 75.000 Da entspricht dem des Blutes, weshalb sie als Blutplasmaersatzmittel eingesetzt werden kann [1].

Die molaren Massen von Dextranen und Pullulanen und deren Verteilung werden mit der Gelpermationschromatographie (GPC), auch Größenausschlusschromatographie genannt (englisch: Size Exclusion Chromatography, SEC), bestimmt. Alternativ kann auch ein Feld-Fluss-

Fraktionierungs-System (FFF) verwendet werden. Ein FFF-System bietet im Vergleich zu einem GPC/SEC-System den wichtigen Vorteil, dass auch Polysaccharide mit sehr großen Molaren Massen (mehrere Millionen g/mol) noch zuverlässig und quantitativ gemessen werden können. Im Fall der GPC/SEC wirkt die Trennsäule ab einer gewissen Molaren Masse und molekularen Größe wie ein Filter; größere Molare Massen werden auf der Trennsäule zurückgehalten und erreichen somit nicht mehr den Detektor. Die Wiederfindung für die Probe nimmt stark ab.

Ein einfaches GPC/SEC- oder FFF-System, das nur mit einem Brechungsindexdetektor ausgestattet ist, muss mit Polymerstandards mit bekanntem Molekulargewicht kalibriert werden. Idealerweise sollten die für die Kalibration verwendeten Standards eine enge Molekulargewichtsverteilung aufweisen. Im Fall eines GPC/SEC- und FFF-Systems, das mit wässrigen Eluenten betrieben wird, haben sich zwei Arten von Polymerstandards als besonders geeignet herausgestellt: Man verwendet in der Regel eng verteilte Pullulane als Kalibrationsstandards. Manche Anwender kalibrieren ihr GPC/SEC-System oder FFF-System aber auch mit eher breit verteilten Dextranstandards. Doch obwohl Pullulane und auch Dextrane zur Substanzklasse der

Tab. 1: Relative und absolute Molekulargewichte von verzweigten Dextranen vermessen gegen eine Kalibrierung mit linearen Pullulanstandards und mit der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung

	Relative Molare Masse (g/mol)	Absolute Molare Masse (g/mol)
Dextran 49000 g/mol	44334	49700
Dextran 148000 g/mol	115319	155000
Dextran 273000 g/mol	168727	276000
Dextran 668000 g/mol	346819	744000

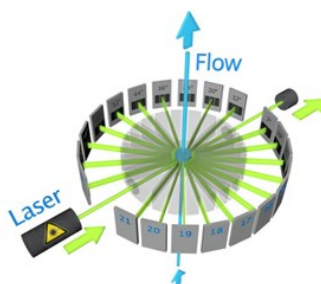


Abb. 4: Prinzipieller Aufbau eines statischen Mehrwinkel-Lichtstreuendetektors (MALS)

Polysaccharide zählen und aus demselben monomeren Zuckerbaustein aufgebaut sind, resultieren bei der so genannten relativen Messung der Molekulargewichte von verzweigten Dextranen gegen eine Kalibrierkurve, die mit linearen Pullulanstandards erzeugt wurde, und der absoluten Messung der Molekulargewichte von Dextranen mittels der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS = Multi Angle Static Laser Light Scattering, Abbildung 4) vollkommen

unterschiedliche Ergebnisse, wie die Tabelle 1 zeigt:

Der Grund für die teils sehr deutlichen Unterschiede in den Ergebnissen sind die unterschiedlichen Strukturen der beiden Polysaccharide. Verzweigungen im Dextranmolekül führen zu einer höheren molekularen Dichte bei gleicher Größe des Moleküls im Vergleich zum linearen Pullulanmolekül; das Elutionsvolumen wird aber nur vom hydrodynamischen Radius des Moleküls bestimmt. Bei gleichem hydrodynamischen Radius und somit gleichem Elutionsvolumen weisen die stark verzweigten Dextranmoleküle daher eine deutlich höhere absolute molare Masse auf im Vergleich zur relativen molaren Masse, die aus einer Kalibrierung mit Pullulanstandards resultiert. Je höher die molare Masse der Dextranmoleküle, umso deutlicher ist der Unterschied zwischen der relativen molaren Masse und der wirklich vorhandenen, absoluten molaren Masse der Dextranmoleküle.

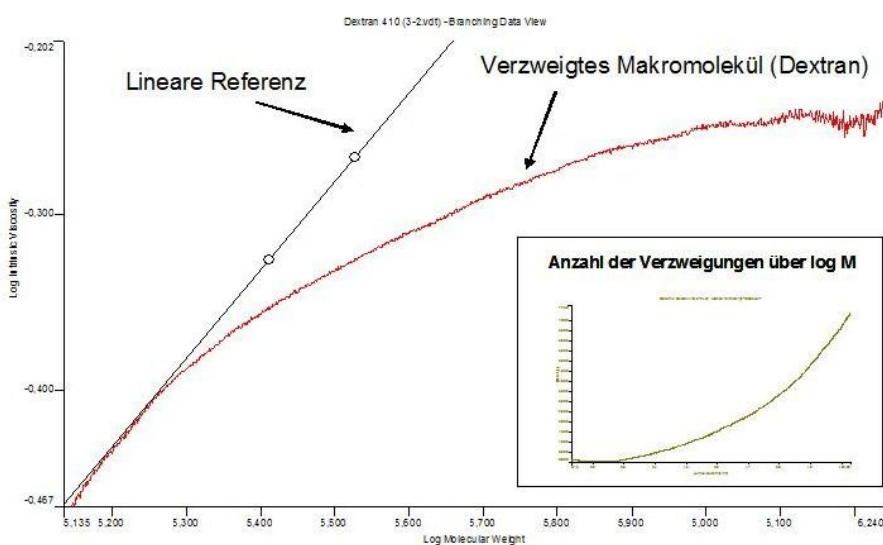


Abb. 5: Kuhn-Mark-Houwink-Sakurada-Plot einer verzweigten Dextranprobe

Deutlich wird dieser Effekt wenn man den so genannten Kuhn-Mark-Houwink-Sakurada-Plot einer Dextranprobe betrachtet (Abbildung 5). In diesem Plot werden logarithmisch die Intrinsic Viskositäten der Dextranprobe über deren Molekulargewichtsverteilung dargestellt.

Die rote Kurve zeigt dass die Intrinsic Viskositäten der Dextranprobe nicht linear mit dem Molekulargewicht ansteigen wie dies beim linearen Pullulan der Fall wäre, viel mehr werden sie geringer bei steigendem Molekulargewicht. Dies führt zu einer Erhöhung der molekularen Dichte da die Masse im Polymerknäuel zunimmt.

Exakt den umgekehrten Effekt beobachtet man bei sehr kettensteifen Polysacchariden wie z. B. der Hyaluronsäure. In diesem Fall sind die Werte für das absolute Molekulargewicht meist deutlich geringer als die gegen eine Pullulan-Kalibrierung gemessenen Werte. Dies ist auf die sehr offene, eher gestreckte Form des linearen Hyaluronsäuremoleküls zurückzuführen. Ein Hyaluronsäuremolekül hat einen sehr viel größeren hydrodynamischen Radius als ein vergleichbar schweres Pullulanmolekül. Es eluiert daher deutlich früher und täuscht ein höheres Molekulargewicht vor. Die absoluten Molaren Massen lassen sich nur mit der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung bestimmen, da nur diese Technologie die wahre molekulare Masse eines Biopolymermoleküls, unabhängig von dessen Elutionsvolumen, bestimmen kann [2].

Vorsicht bei der Verwendung von Pullulanen und Dextranen als Kalibrierstandards mit bekanntem Molekulargewicht in der GPC/SEC und der FFF

Pullulane und Dextrane werden, wie schon erwähnt, oft als Kalibriersubstanzen in der wässrigen GPC/SEC und der FFF verwendet. Anhand von Standards mit bekanntem Molekulargewicht werden die Elutionszeiten bestimmt und damit eine Kalibrierkurve der Molekulargewichte gegen die Retentionsvolumen erstellt. Dafür genügt ein einfaches GPC/SEC- oder FFF-System, das nur mit einem Brechungsindexdetektor ausgestattet sein muss.

Pullulane eignen sich hervorragend als Molekulargewichtsstandards; durch ihren streng linearen Kettenaufbau sind sie chemisch gesehen nahezu genauso exakt definiert wie z. B. ein lineares Polystyrolmolekül. Die am Markt verfügbaren Pullulane sind außerdem meist sehr eng verteilt mit Polydispersitäten (M_w/M_n) unterhalb von 1,2.

Genau das Gegenteil gilt aber für Dextrane. Kommerziell erhältliche Dextrane sind meist breit verteilt mit Polydispersitäten von deutlich über 1,2. Das größte Problem ist aber die nicht vorhandene Vergleichbarkeit von Charge

zu Charge. Ein in diesem Jahr hergestellter Dextranstandard mit einem Molekulargewicht von z. B. 250.000 g/mol kann sich in seiner willkürlich wachsenden Verzweigungsstruktur erheblich von einem Dextranstandard mit demselben Molekulargewicht unterscheiden, der ein Jahr später erzeugt wurde. Die Unterschiede in den Verzweigungen führen bei gleichem Molekulargewicht zu einer unterschiedlichen molekularen Dichte und somit auch zu einer unterschiedlichen molekularen Größe. Die beiden Dextrane mit identischem Molekulargewicht würden demnach in der GPC/SEC und der FFF zu unterschiedlichen Zeiten eluieren und somit unterschiedliche Molekulargewichte vortäuschen. Für eine solche Art der Kalibrierung (Molekulargewicht gegen Retentionsvolumen) sind Dextrane daher nicht geeignet. Ihre Molekulargewichte sind nur zuverlässig, wenn sie mit der Mehrwinkel-Lichtstreuung gemessen wurde. Diese Methode ist unabhängig vom Elutionsvolumen und zeigt die gesamte vorhandene Masse, unabhängig auch von der Verzweigungsstruktur des Dextranmoleküls.

Fazit

Die aus monomeren Zuckereinheiten aufgebauten Polysaccharide bilden eine sehr interessante Substanzklasse. Obwohl sie sich chemisch sehr ähnlich sind, können Polysaccharide aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Verknüpfungsstruktur vollkommen unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Es gibt sehr kompakte Polysaccharide mit einer hohen molekularen Dichte wie z. B. das hochverzweigte Dextran, es gibt aber auch lineare Polysaccharide, wie beispielweise das Pullulan und als sehr extremer Fall die sehr kettensteife Hyaluronsäure, die eine sehr geringe molekulare Dichte und eine gestreckte Molekülform aufweist. Versucht man das Molekulargewicht dieser Stoffe mit einer herkömmlichen GPC/SEC- oder FFF-Anlage zu bestimmen, die nur mit einem Brechungsindexdetektor ausgestattet ist, und verwendet z. B. lineare Pullulane als Kalibrierstandards, erhält man falsche Resultate für alle anderen Arten

von Polysacchariden, da sich die molekularen Verknüpfungsstrukturen und somit auch die hydrodynamischen Radien der verschiedenen Polysaccharide bei gleicher molarer Masse sehr stark unterscheiden. Die Proben eluieren daher zu völlig anderen Zeiten als die Standards und täuschen somit andere molare Massen vor. Die Ergebnisse sind aber dennoch reproduzierbar, da Pullulane chemisch exakt definiert sind und auch enge Verteilungen aufweisen. Dextrane eignen sich, im Gegensatz zu Pullulanen, aufgrund ihrer willkürlichen und variierenden Verzweigungsstruktur und ihrer meist breiten Molekulargewichtsverteilung aber nicht als Molekulargewichtsstandards für eine relative Kalibrierung in der GPC/SEC und der FFF. Die absoluten molaren Massen von Dextranmolekülen und anderen Polysacchariden lassen sich exakt und zuverlässig nur mit der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung bestimmen.

Literatur

[1] W. Blaschek, W. Burchard, G. Franz, H. Koch, H. Koehler, E. Niirnberg, H. Roper, H. Wagner, *Polysaccharide*, Springer Verlag, 1991, ISBN-13:978-3-540-54002-1

[2] P. Kratochvil "Classical Light Scattering from Polymer Solutions" Elsevier, Amsterdam 1987, ISBN: 0-444-42890-9